

学 位 論 文 題 目

ウイルソン病治療薬トリエンチンの体内動態と吸収機構の解明

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ウイルソン病は、肝臓におけるセロプラスミン合成能の低下あるいは不全を起因とした銅排泄障害により、肝臓、大脳などに障害をおこす難病である。その治療には銅のキレート剤であるD-ペニシラミンが用いられているが重篤な副作用のためその使用が妨げられる例が少なくない。近年、D-ペニシラミンと同等の銅排泄能を有し、かつ副作用の少ないトリエチレンテトラミン・2塩酸塩(トリエンチン)が市販され、本薬はウイルソン病における第一選択薬になりうるものと期待されている。当研究室ではこれまでに、トリエンチンを投与されたウイルソン病患者およびラットの血液中の未変化体濃度および生物学的有効利用率は低いこと、並びにラットにおいて尿中に多量のアセチル代謝物が排泄されることを見いだしている。今回、トリエンチンの体内動態をさらに明らかにする目的で、ウイルソン病患者およびラットにトリエンチンを投与した後の、未変化体およびアセチル代謝物の血中濃度、尿中排泄、体内分布について詳細な検討を行った。さらに、ラットにおけるトリエンチンの消化管吸収機構について、類似構造を有する生体内ポリアミンとの比較を行ったのでここに報告する。

II. 対象と方法

1. 対象と試薬

トリエンチンは株式会社ツムラより供与されたものを用いた。その他の試薬はすべて市販品特級を用いた。対象患者は、北海道大学医学部附属病院小児科外来に通院治療中のウイルソン病患者8例とし、本試験の説明を行い、同意を得た上でトリエンチンを投与した。実験動物にはWistar系雄性ラット(体重250—300g)を用いた。

2. 血中濃度推移と尿中排泄挙動

各患者に3日間の休薬後、朝食前にトリエンチンを経口投与し、採血および蓄尿により試料を得た。またラットには生理食塩水に溶解したトリエンチンを頸静脈内又は経口投与し、経時的に採血を行った。体内分布に関しては、ラットにトリエンチンを静脈内あるいは経口投与1時間後、臓器を摘出し分布した薬物の定量を行った。

3. ラット小腸刷子縁膜小胞(BBMV)透過実験

BBMVの調製はKessler等の Ca^{2+} 沈澱法に準拠して行い、取り込み実験は迅速濾過法に準拠して行った。メンブランフィルター(Millipore, HAWP)を用い、BBMVを捕獲し、フィルター毎超音波処理することによりトリエンチンを浸出させ、HPLCの測定試料とした。

4. 定量法

血漿中トリエンチン未変化体の定量は、Miyazakiらが確立した蛍光HPLC法により行った。アセチル代謝物量は、試料を塩酸加水分解により脱アセチル化し、すべて未変化体とした後に定量し、これより未変化体濃度を減じて求めた。血漿中濃度下面積(AUC)は台形法により、

また生物学的有効利用率 (BA) は下式により算出した。

$$BA(\%) = \frac{\text{経口投与後のAUC}}{\text{静脈内投与後のAUC}} \times \frac{\text{静脈内投与量}}{\text{経口投与量}} \times 100$$

III. 結果

1. ウイルソン病患者におけるトリエンチンの血漿中濃度推移と尿中排泄挙動

各患者間において血漿中濃度推移は、未変化体、代謝物とも変動が大きく、また投与量と未変化体および総量のAUCとの間には何ら相関性は認められなかった。さらに、未変化体に比べ多量の代謝物が尿中排泄され、血中においても投与後初期に未変化体とほぼ同量の代謝物が検出された。

2. ラットにおける血中濃度推移

静脈内投与及び経口投与後初期において、ウイルスン病患者と同様に未変化体とほぼ同量の代謝物が検出された。また、6時間までのAUCから算出したトリエンチンの生物学的有効利用率は、未変化体 (17.5%) および総量 (13.8%) とともに極めて低いことが認められた。

3. トリエンチンの臓器移行性

経口投与群、静脈内投与群ともに、血漿中トリエンチン濃度に対し肝、および腎臓中濃度は高く、両臓器への移行性が高いことが認められた。一方、脳および脂肪組織への移行性は極めて低いものであった。

4. ラット小腸刷子縁膜小胞(BBMV)透過性

1) 生体内ポリアミン類との比較

トリエンチンのBBMVへの取り込みは、ほぼ10分で平衡状態となり、また、膜結合を有さないD-glucoseに比べ平衡取り込み値は約2.5倍大きく、明らかな小胞内濃縮が認められた。さらに、トリエンチンの取り込みは、温度依存性、pH依存性を示し、一方、内部負のイオン拡散電位は何ら影響を与えなかった。これらの結果は構造類似物であるポリアミンで得られた結果と良く一致した。

2) トリエンチンの取り込みに対するスベルミン、スベルミジンの阻害効果

トリエンチンの初期取り込み速度は濃度飽和性を示し、Lineweaver-Burk plotによる解析により $K_m=1.13\text{mM}$ 、 $V_{max}=2803\text{pmol/mg protein /30sec}$ と算出された。この K_m 値はスベルミン($30.8\mu\text{M}$)やスベルミジン($148\mu\text{M}$)に比べ大きな値であった。次に K_m 値付近の 1mM でスベルミン、スベルミジンによる阻害実験を行った結果、共に濃度依存的な膜透過速度阻害を示し、その効果はスベルミンの方が強かった。さらに、スベルミンによる阻害形式は拮抗型を示し、 K_i 値は $18.6\mu\text{M}$ と算出された。この値はスベルミンの K_m 値とほぼ一致したものであった。

IV. 考察

ウイルスン病患者およびラットにトリエンチンを投与した結果、未変化体に比べ多量の代謝物が尿中排泄され、また投与後初期において未変化体とほぼ同量の代謝物が血漿中より検出されたことから、トリエンチンは消化管より吸収された後、速やかに代謝されていることが示唆された。体内分布の検討により、経口、静脈内投与両群共にトリエンチンは肝臓と腎臓に移行しやすいことが認められ、両臓器においてトリエンチンは良好な除銅効果を発揮すると考えられる。一方、ウイルスン病において肝臓・腎臓とともに障害を受ける臓器である大脳への移行性は低いものであった。

トリエンチンは食物によりその吸収性が抑制されることが知られている。今回、ウイルスン病患者では食前に投与したにもかかわらず、未変化体および総量の血中濃度は低く、また患者間での吸収性は大きく変動していた。このことより食事以外にもトリエンチンの吸収過程に影響を与える因子の存在が考えられる。この因子を明らかにする目的で、ラット小腸BBMVを用

いてトリエンチンの吸収機構について検討した結果、1) 小胞内濃縮 2) 温度依存性 3) pH 依存性 4) 内部負の拡散電位非依存性の点でスベルミン、スベルミジンとほぼ同様の特徴を示した。又、ポリアミンによる阻害実験によりトリエンチンの膜透過速度は濃度依存的に阻害され、その阻害形式は拮抗型であることが示された。以上の結果よりトリエンチンは生体内ポリアミンと同一の機構により膜透過していることが強く示唆された。小腸管腔内には、生体内ポリアミンが高濃度に存在していることが知られている。したがって、これら消化管内に多量に存在するポリアミンによって吸収が抑制されることにより吸収が悪く、またポリアミン量の変動することより患者間で吸収性にバラツキが大きかったものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 勝 巳

副 査 教 授 齋 藤 秀 哉

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 目

ウイルソン病治療薬トリエンチンの体内動態と吸収機構の解明

ウイルソン病は、肝臓におけるセロプラスミン合成能の低下あるいは不全を起因とした銅排泄障害により、肝臓、大脳などに障害をおこす難病である。その治療にはD-ペニシラミンが主に用いられてきたが、重篤な副作用のためその使用が妨げられる例が少なくない。一方、トリエチレンテトラミン・2塩酸塩（トリエンチン）はD-ペニシラミンと同等の銅排泄能を有し、かつ副作用が少ないことより、ウイルソン病における第一選択薬になりうるものと期待されている。しかしながらトリエンチンはオーファンドラッグであるため、薬物の体内動態に関する知見は乏しく、この点を明らかにすることは、薬効と体内動態の関係を知り、かつ適正な薬物療法を進める上で極めて重要である。したがって申請者は、トリエンチンの体内動態を解明する目的で、ウイルソン病患者およびラットにトリエンチンを投与した後の、未変化体およびアセチル代謝物の血漿中濃度推移、尿中排泄、体内分布について詳細な検討を行った。さらに、ラットにおけるトリエンチンの消化管吸収機構について、類似構造を有する生体内ポリアミンとの比較を行い、併せてポリアミンとの膜透過における阻害実験についても検討を加えた。

対象患者は、北海道大学医学部附属病院小児科外来に通院治療中のウイルソン病患者8例とし、本試験の説明を行い、同意を得た上で測定試料を得ている。すなわち、各患者に3日間の休薬後、朝食前にトリエンチンを経口投与し、採血および蓄尿により試料を得た。実験動物にはWistar系雄性ラット（体重250-300g）を用い、トリエンチン未変化体およびアセチル代謝物の経時的な血中濃度推移、および投与1時間後の各臓器中の薬物濃度を測定している。また消化管からの吸収機構を詳細に検討するためにラット小腸刷子縁膜小胞（BBMV）を調製し、膜透過実験に用いている。トリエンチンの定量は、申請者の研究室にて新たに開発した感度の優れた蛍光HPLC法により行ない、アセチル代謝物の濃度は、試料を塩酸加水分解により全て未変化体とした後に定量し、これより未変化体濃度を減じて求めている。

ウイルソン病患者における体内動態の検討では、投与後初期に未変化体とほぼ同量の代謝物を血漿中より検出し、また、尿中からも多量の代謝物を検出している。このとき血漿中濃度推移は、未変化体・代謝物とも患者間での変動が大きく、投与量と未変化体および総量（未変化体+アセチル代謝物）のAUCとの間には何ら相関性を認めていない。一方、ラットにおいてもウイルソン病患者と同様に、投与後初期に未変化体とほぼ同量の代謝物を血漿中より検出している。さらに、ラットにおけるトリエンチンの生物学的有効利用率

は、未変化体（17.5%）および総量（13.8%）ともに極めて低いことを明らかにしている。これらの知見は、トリエンチンの消化管からの吸収性は比較的 low、かつ吸収後、速かにアセチル体に代謝されることを示すものであり、吸収と代謝における移行動態が今回初めて明らかにされたことは評価に値する。また体内分布にかんしては、経口・静脈内投与群ともに肝および腎臓への移行性は高く、脳および脂肪組織への移行性は極めて低いものであった。このことは、銅が蓄積しやすい肝、腎臓でトリエンチンが効率的に作用していることを示唆している。

吸収機構にかんしては、BBMVへの詳細な取り込み実験によって、トリエンチンは構造類似物であるポリアミン類（スベルミン、スベルミジン）と同様に小胞内濃縮、温度依存性、pH依存性、濃度飽和性、内部負のイオン拡散電位非依存性を示すことを明らかにしている。また、トリエンチンの K_m 値は1.13 mMと算出しており、ポリアミン類よりも膜親和性は低い。さらにトリエンチンの膜透過は低濃度のポリアミン類によって濃度依存的に拮抗阻害されることを明らかにしている。小腸管腔内には、実験に用いた程度のポリアミン類は常に存在することより、これらの結果はトリエンチンの低吸収性の一因を示すものであり、同時に消化管内のポリアミン量の変動が吸収性（血漿中濃度）の変動に大きく関与していることを強く示唆するものである。

今後トリエンチンの吸収性を上げ、安定した血中濃度を得るための化学的および製剤学的改良が加えられることにより、ウィルソン病患者に対するより良い薬物療法がなされることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。